

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05956

研究課題名(和文) ブタの時間栄養学ことはじめ 「飼料摂取と消化吸収」の日内変動の解明

研究課題名(英文) Introduction to chrono-nutrition of the pig -elucidating diurnal variation of feed intake and digestion-

研究代表者

勝俣 昌也 (Katsumata, Masaya)

麻布大学・獣医学部・教授

研究者番号：60355683

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：7時～19時明期、19時～7時暗期の光環境、24時間不断給餌、24時間自由飲水の条件で離乳育成豚を飼育した。1時間あたりの飼料摂取量は13時～19時が最も活発で、離乳育成豚は明期(活動期)の後半に活発に飼料摂取することが明らかとなった。空腸では時計遺伝子のBmal1、Per1、Per2とグルコーストランスポーターのSGLT1とGLUT2のmRNA発現量が日内変動を示したが、回腸ではこれらのmRNA発現量は日内変動しなかった。

以上のように、「離乳育成豚の飼料摂取は明確な日内変動を示すこと」「空腸では時計遺伝子とグルコーストランスポーターのmRNA発現量が日内変動を示すこと」が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

何をどれだけ摂取しなければならないかを解明することが栄養学の使命である。近年では、何をどれだけ「いつ」摂取しなければならないかを解明する時間栄養学が重要視されている。家畜を対象とした時間栄養学はこれから始動するところであり、本研究は時間栄養学に立脚したブタへの効率的な飼料給餌方法の確立を目指している。離乳育成豚の飼料摂取と空腸における時計遺伝子とグルコーストランスポーターのmRNA発現量の日内変動を本研究で明らかにした。これらの成果は家畜における時間栄養学の先導的成果として価値が高く、時間栄養学に立脚したブタへの効率的な飼料給餌方法の確立に向けて重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Weanling-growing pigs were reared under a light condition being bright from 7:00 to 19:00 and being dark from 19:00 to 7:00, with 24 hours ad libitum feeding. Drinking water was always available. Feed intake per one hour was the highest from 13:00 to 19:00, indicating that weanling-growing pigs are active in the latter half of the bright period (active phase). In the jejunum, mRNA expression levels of the clock genes Bmal1, Per1, and Per2 and the glucose transporters SGLT1 and GLUT2 showed diurnal variation, while in the ileum these mRNA expression levels did not vary diurnally. In summary, we found that "feed intake of weanling grower pigs shows clear diurnal variation" and "clock gene and glucose transporter mRNA expression levels in the jejunum" show diurnal variation.

研究分野：家畜栄養学

キーワード：ブタ 時間栄養学

1. 研究開始当初の背景

「なにをどれだけ食べなければいけないか」に答えることが長く栄養学の役割であり、家畜栄養学は栄養素要求量を明らかにすることに力を注いできた。育種改良ともなう家畜の能力向上にあわせるために、栄養素要求量のブラッシュアップは産業には重要だが、科学としての斬新さは小さい。その上、家畜栄養学の成果はすでに飽和しつつあった。Animal誌(IF1.921)に2016年に掲載されたブタの栄養に関する報告は19編あったが、内容は、栄養素要求量、飼料の給与量や栄養素の含量の影響、機能性資材の効果に分類できた。堅実ではあるが、斬新さはなく、波及効果も限定されると思われた。家畜栄養学にも新しい切り口を導入しなければ、新しい研究シーズを創出できない状況にあった。

ところで、動物の摂食行動にも24時間周期の日内変動があり、夜行性のラットやマウスが暗期に飼料を摂取するのはその一例である。また、マウスの栄養素の消化吸収にも日内変動が報告されていた(Fatimaら,J Gastrointest Surg, 2009)。実際、「なにをどれだけいつ食べなければいけないか」に答えるための時間栄養学に関する研究がさかんになり、日本では、2014年に時間栄養科学研究会が活動を始めた(2020年1月には時間栄養学会に移行した)。このように日本国内でも時間栄養学はさかんになったものの、家畜を対象とした時間栄養学の研究成果はまだ見当たらない状況にあった。

2. 研究の目的

どの時間帯にブタに給餌すれば消化吸収がよくなるのだろうか? 研究開始当初のわたしたちの問題意識である。新しい切り口である時間栄養学を導入して、ブタの消化吸収が最適になる給餌時刻を明らかにすることが本研究の出口である。

出口を目指す第一歩として、ブタの「飼料摂取と消化吸収」の日内変動を明らかにすることを研究の具体的な目的とした。このことを明らかにすれば、ブタの消化吸収の日内変動にあわせて給餌するという新技術の開発につながり、飼料効率を格段に高め、養豚の生産性が向上する。

3. 研究の方法

供試豚:3週で離乳した去勢雄豚(系統名スイートマミー、株式会社シムコ館山農場から導入)を実験に供した。

実験実施場所と実験実施期間:麻布大学豚舎施設の離乳育成室で飼養試験を実施した。飼養した豚房のサイズは1.62m×0.90mである。導入後4日間は飼育環境に馴致させるために2頭を1つの豚房で飼育し、5日目からは個別飼育とした。7日目から3週間の飼養試験を開始した。

供試飼料:子豚用の市販人工乳(日本農産工業社製ウイニーAとウイニーB)を給与した。供試豚の日齢が進むのにもとない(つまり体重増加にもとない)ウイニーAからウイニーBに切り替えた。飼料給与は不断給餌、水は自由飲水とした。

光環境:離乳育成室の照明は7時点灯、19時消灯(12時間明・12時間暗)の条件とした。したがって7時がZT0となる。

飼料摂取量の測定:1日24時間を7時から13時(ZT0からZT6)、13時から19時(ZT6からZT12)、19時から7時(ZT12からZT0)の3つの時間帯に分けた。そして、それぞれの時間帯における飼料摂取量を測定し、1時間あたりの飼料摂取量を計算した。

サンプル採取:3週間の飼養試験終了時に、3時(ZT20)、9時(ZT2)、15時(ZT8)、21時(ZT14)に血清、空腸、回腸、肝臓、菱形筋を採取した。

分析:分析項目と部位を表1示す。

表 1

分析項目	部位
膜消化酵素(2 糖類分解酵素(マルターゼ、ラクターゼ、スクラーゼ)、アミノペプチダーゼ N) 活性	空腸、回腸
時計遺伝子(Bmal1、Clock、Per1、Per2、Cry2) の mRNA 発現量	空腸、回腸、肝臓、菱形筋
時計遺伝子 Bmal1 のタンパク質発現量	空腸
グルコーストランスポーター (SGLT1、GLUT2) の mRNA 発現量	空腸、回腸
アミノ酸トランスポーター(Cat1、Cat2、Cat3、SLC7a7、SLC7a9、SLC6a19)	空腸、回腸、肝臓、菱形筋
遊離アミノ酸	血清

4. 研究成果

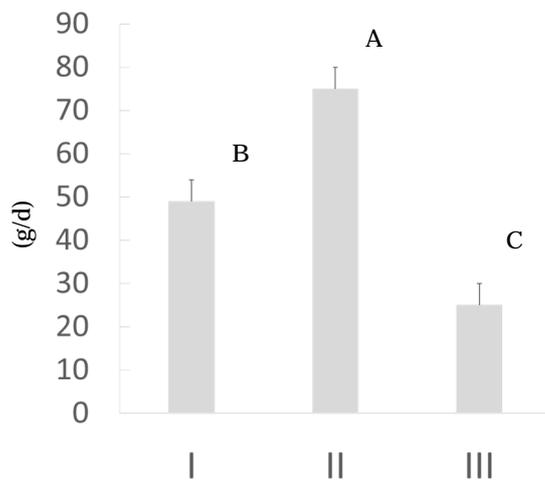


図 1 プタの飼料摂取の日内変動
 I: ZT0-ZT6, II: ZT6-ZT12, III: ZT12-ZT0
 最小二乗平均±Pooled SE
 A,B,C ; P<0.01

図 1 にブタの飼料摂取の日内変動を示した。ブタは明期 (ZT0-ZT12) の飼料摂取量が高く、とくに明期の後半 (ZT6-ZT12) に活発に飼料を摂取していることが明らかになった。ブタは明期に活発に活動する昼行性動物ということ、この結果からあらためて確認できた。一方、飼料摂取が暗期に停止することもなかった。12 時間の暗期にまんべんなく少しずつ飼料を摂取するのか、それとも、明期が近づくと飼料摂取を開始するのかは、本研究では明らかにできなかった。

表 2 に空腸と回腸の 2 糖類分解酵素 (マルターゼ、ラクターゼ、スクラーゼ) なら

びにアミノペプチダーゼ N の活性を示した。空腸ではいずれの酵素活性の平均値も ZT2 がもっとも高かったが、データのばらつきが大きくサンプル採取時刻の影響は検出できなかった。回腸ではデータのばらつきは小さかったもののサンプル採取時刻の影響は検出できなかった。また、空腸の酵素活性の方が回腸よりも高かった (ラクターゼ : P<0.05、マルターゼ、スクラーゼ、アミノペプチダーゼ N : P<0.10)。本研究では供試豚を 24 時間不断給餌で飼育したが、図 1 に示したように、暗期にも一定量の飼料を摂取した。したがって、量の変動はあるものの小腸には常に食塊が存在し、このことが、いずれの膜消化酵素活性にもサンプル採取時刻の影響を検出できなかった一因かもしれない。糖、ペプチド、アミノ酸はおもに空腸で吸収されるので空腸の酵素活性が回腸よりも高いのだろう。

表2 空腸と回腸の2 糖類分解酵素 (単位/分/mg タンパク質) ならびに
アミノペプチダーゼ N の活性 (mmol/分/mg タンパク質)

	ZT20	ZT2	ZT8	ZT14	Pooled SE
空腸					
マルターゼ	0.39	1.00	0.42	0.71	0.33
ラクターゼ	0.06	0.18	0.05	0.14	0.06
スクラーゼ	0.03	0.06	0.03	0.04	0.02
アミノペプチダーゼ N	0.90	3.28	1.17	1.48	1.12
回腸					
マルターゼ	0.21	0.31	0.25	0.24	0.04
ラクターゼ	ND	0.01	<0.01	ND	<0.01
スクラーゼ	0.02	0.02	0.02	0.02	<0.01
アミノペプチダーゼ N	0.46	0.57	0.58	0.64	0.10

図 2(1),(2)に空腸と回腸の時計遺伝子の mRNA 発現量を示した。空腸の時計遺伝子 Bmal1 の mRNA 発現量は ZT8 と ZT14 が ZT20 と ZT2 よりも高い ($P<0.05$) という日内変動を示した。一方で、回腸では日内変動しなかった。Clock の mRNA 発現量は空腸でも回腸でも日内変動しなかった。空腸の Per1 と Per2 の mRNA 発現量は ZT2 がもっとも高く、ZT14 がもっとも低いという日内変動を示した。一方、回腸ではいずれも日内変動しなかった。図 2(3),(4)に肝臓と菱形筋の時計遺伝子の mRNA 発現量を示した。肝臓、菱形筋ともに Per1、Per2、Cry2 の発現量は日内変動を示した—ZT2 と ZT8 の発現量が高く、ZT0 と ZT14 の発現量が低かった。図 3 に空腸の Bmal1 のタンパク質発現量を示した。ZT14 の発現量がもっとも高く、「ZT14 と ZT2」ならびに「ZT14 と ZT8」の発現量には差を検出した。

Bmal1 と Clock はタンパク質として複合体を形成し、時計遺伝子発現制御配列の E-box を介して Per1 と Per2 の転写を促進する。そして、Per と Cry のタンパク質としての複合体は Bmal1 の発現を抑制する。すると Per と Cry の発現も低下に転じ、次いで Bmal1 の発現が高くなる。これが時計遺伝子の発現が日内変動するメカニズムの概要である。したがって、Bmal1 の発現が高くなってから、Per1 と Per2 の発現が高くなる。空腸では Bmal1 の mRNA 発現量は ZT8 と ZT14 にもっとも高くなり、その後、Per1 と Per2 の mRNA 発現量は ZT2 にもっとも高くなった。さらに、ZT2 には Bmal1 の mRNA 発現量は低下していた。これらのことから 24 時間不断給餌したブタでは時計遺伝子発現の日内変動を E-box を介して調節する機構が空腸に存在することを示唆している。空腸の Bmal1 のタンパク質発現量は ZT14 がもっとも高く、次いで ZT20、ZT2 と ZT8 には低かった (データは示さない)。mRNA 発現が ZT8 から ZT14 にかけて高くなり、その後、タンパク質への翻訳が高くなったことを示している。

図 2a,b には空腸と回腸のグルコーストランスポーター SGLT1 と GLUT2 の mRNA 発現量を示した。空腸では SGLT1 の mRNA 発現量は ZT20 と ZT2 が高いという日内変動を示した。GLUT2 は「ZT20 ならびに ZT2」と「ZT8 ならびに ZT14」の発現量に間に差があった—ZT20 と ZT2 が高いという点では SGLT1 と同じだった。

Bmal1 は SGLT1 遺伝子の転写調節領域に結合する。このことは Bmal1 には SGLT1 の mRNA 発現を促進する効果があることを示唆している。空腸では Bmal1 の mRNA 発現量が ZT8 と ZT14

に高く、タンパク質の発現量は ZT14 に高かった。Bmal1 タンパク質発現が高くなり、SGLT1 の転写調節領域への結合が高くなった後の ZT20 と ZT2 に SGLT1 の mRNA 発現量が高くなったようだ。空腸では GLUT2 の mRNA 発現にも日内変動が認められた。どのようなメカニズムが関与しているのかを解明することは今後の課題である。

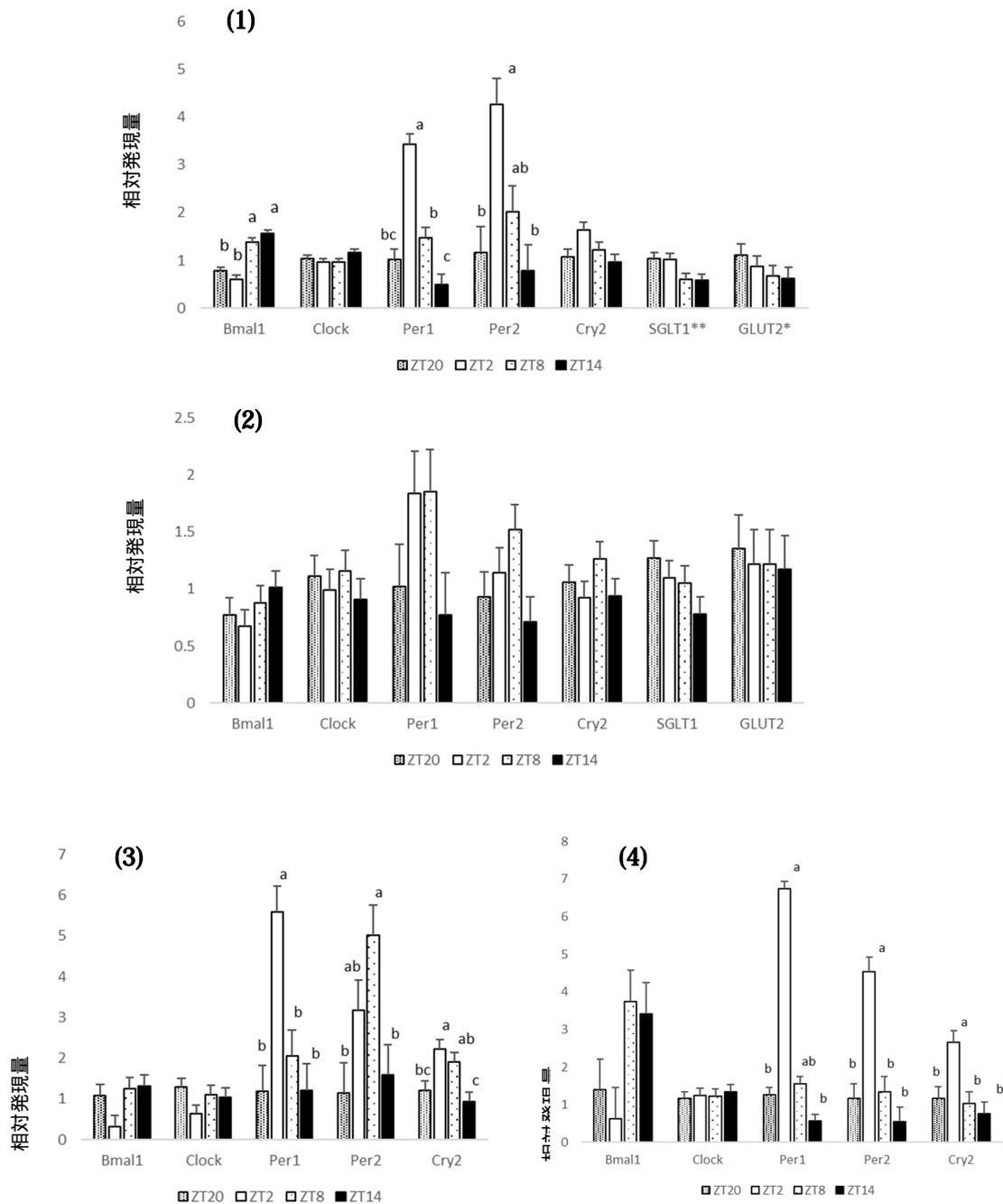


図2 各組織の時計遺伝子とグルコーストランスポーターの mRNA 発現量
 (1):空腸、(2):回腸、(3):肝臓、(4):菱形筋、最小 2 乗平均値 ± pooled SE
 (1):空腸の SGLT1 の** 日内変動を検出、GLUT2 の*「ZT20 ならびに ZT2」と「ZT8 ならびに ZT14」の間に差を検出
 a,b,c ; P<0.05

本研究では血清遊離アミノ酸濃度の日内変動とアミノ酸トランスポーター(Cat1、Cat2、Cat3、SLC7a7、SLC7a9、SLC6a19)の mRNA 発現量の空腸、回腸、肝臓、菱形筋での日内変動も測定した。しかし、いずれも明確な日内変動を観察することはできなかった(データは示さない)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Y. Kinoshita, H. Takahashi, M. Katsumata	4. 巻 8
2. 論文標題 Circadian rhythms of the mRNA abundances of clock genes and glucose transporters in the jejunum of weanling-growing pigs	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary Medicine and Science	6. 最初と最後の頁 1113-1118
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/vms3.746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 木下優希・八田愛未・井出深・高橋隼太・ウィルキンソン皇月・勝俣昌也
2. 発表標題 子豚の小腸のグルコーストランスポーターならびに 肝臓と菱形筋の分岐鎖アミノ酸分解系酵素のmRNA発現量の日内変動
3. 学会等名 関東畜産学会2020年度学生優秀発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井出深、高橋隼太、ウィルキンソン皇月、木下優希、八田愛未、勝俣昌也
2. 発表標題 子豚の小腸のアミノ酸トランスポーターmRNA発現量と血漿遊離アミノ酸濃度の日内変動
3. 学会等名 関東畜産学会第74回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 子豚の小腸における膜消化酵素活性および時計遺伝子のmRNA発現量の日内変動
2. 発表標題 高橋隼太、井出深、ウィルキンソン皇月、木下優希、八田愛未、勝俣昌也
3. 学会等名 関東畜産学会第74回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Katsumata and S. Wilkinson
2. 発表標題 Diurnal variations of activities of disaccharidases and aminopeptidase N in growing barrows
3. 学会等名 International Symposium on Energy and Protein Metabolism and Nutrition 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 勝俣昌也
2. 発表標題 Launching chrono-nutrition for pig husbandary
3. 学会等名 ブタの時間栄養学ことはじめ
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 M. Katsumata and S. Wilkinson	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Wageningen Academic Publishers	5. 総ページ数 504
3. 書名 Energy and protein metabolism and nutrition EAAP publication No. 138	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関